第9卷 第1期　　动 物 学 研 究　　Vol. 9, No. 1
1988年2月　　ZOOLOGICAL RESEARCG　　Feb., 1988

酶标法观察尖吻蝮出血毒素Ⅰ对毛细血管的作用

何华平　王玉珍　徐 洵
（中国科学技术大学生物系　合肥）

摘　要

从尖吻蝮蛇毒中分离得到的出血毒素Ⅰ（AaHI）具有破坏血管系统并造成广泛出血的作用。本文报道用辣根过氧化物酶标记的AaHI可以特异地结合在毛细血管内皮细胞外膜上，由此推测内皮细胞膜上存在HaHI的受体或作用位点。

关键词： 尖吻蝮蛇毒，出血毒素，酶标，蛇毒

从尖吻蝮蛇毒中分离得到的出血毒素Ⅰ（AaHI）具有破坏血管壁，造成广泛出血的作用。早期观察了解到，出血毒素作用于血管壁后，血管壁发生破裂（或毛细血管内皮细胞间隙增大），红细胞外漏。Ownby等报道了蛇毒出血毒素对毛细血管破坏作用的电镜观察，但更深入工作尚未见报道。本文报道使用酶标方法观察AaHI在兔肌组织的分布和作用。目的是观察毒素Ⅰ在动物组织中的特异结合位点，为探讨其出血作用机理及蛇伤防治提供理论基础，也为临床上其它出血性疾病研究寻求共同规律。

材 料 和 方 法

材料　出血毒素Ⅰ（AaHI），按文献方法制备；辣根过氧化物酶（HRP，RZ33），2，4——二硝基氟苯(FDNB)，均为中科院上海生化所东风生化试剂厂产品；过碘酸钠($NaIO_4$)，北京化工厂产品，分析纯；聚乙二醇(PEG)；Sephadex-G75，Pharmacia产品；透射电镜HITAACHI H800型；健康家兔，约2.5kg。

方法　用过碘酸氧化法交联HRP与AaHI。5 mg HRP溶于1.0ml 0.3*M* pH8.1的$NaHCO_3$中，加入0.1ml 1% FDNB，室温下搅拌1小时后加入1 ml 0.16*M* $NaIO_4$，反应30分钟，然入加入1 ml 0.16*M* PEG，室温下搅拌1小时以终止$NaIO_4$的氧化反应。4℃下对0.01*M* pH9.5的$NaHCO_3$-$NaCO_3$缓冲液充分透析，除去FDNB，加入含

本文1986年1月27日收到，1987年5月28日收到修改稿。

5 mg AaH Ⅰ的0.1M pH9.5的Na_2CO_3缓冲液，室温下反应3小时，4 ℃下对0.02M加磷酸缓冲液充分透析。

Sephadex-G75过柱。交联产物过Sephadex-G75柱，用0.02M磷酸缓冲液平衡、洗脱，流速8 ml/hr。

活体处理兔肌肉组织并进行电镜样品制备。家兔致死后迅速解剖腿肌，取一小块立刻投入经液氮预冷的正已烷中，稍后用锋利刀片将肌块修成约2 × 5 × 7 mm大小，控制厚度约25μm进行冰冻切割，蒸馏水中迅速展片后捞出至载玻片上，放潮湿培养皿中，将HRP-AaHI滴在组织切片上，浸没处理1小时，之后用0.2M pH7.2磷酸缓冲液充分漂洗，加入HRP底物H_2O_2和3.3′——二氨基联苯胺四酸盐（DAB），显色反应30分钟，用0.2M pH7.2磷酸缓冲液充分漂洗；以下经过常规电镜制片过程：锇酸固定，丙酮分级脱水，渗透，Epon618包埋，聚合，切片，最后在HITACHI 800型分析电镜上观察。

结　　果

1.交联产物经Sephadex-G75柱分离，洗脱曲线见图1。其中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ峰分别为HRP-AaHI（分子量约66,000）、HRP（分子量约44,000）和AaHI(分子量约22,000)。收集HRP-AaHI，透析、浓缩。

2.电镜观察。如图2。

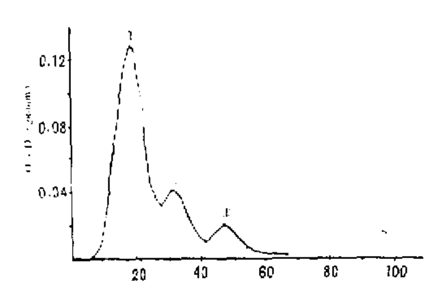


Fig 1. GelFiltration of HRP-AaHI
Sephadex G-75 column (1.5×100) was preequilibrated with 0.02M PBS and eluted with same solution at a flow rate of 8 ml/hr. 2.5ml fractions were collected Ⅰ-HRP-AaHI Ⅱ-HRP Ⅲ-AaHI

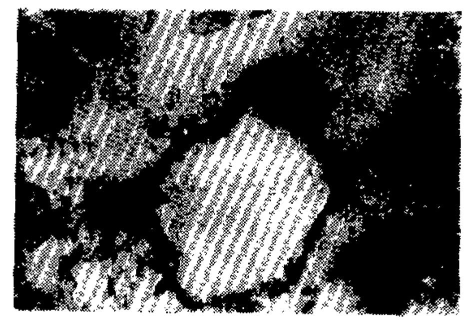


Fig 2. Electromicroscopic photo of HRP-AaHI deposited on capillaries
Specific attachment of HRP-AaHI to the endothelial cells is shown.x70000

讨　　论

尖吻蝮蛇（即五步蛇）蛇毒具强血循毒性，咬伤后主要症状是全身广泛性出血和局部性坏死。本实验室曾从粗毒中分离得到出血毒素Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ，其中以出血毒素Ⅰ的出血活性最大，其最小出血剂量为0.4μg。关于蛇毒出血毒素的作用机理，迄今见到

报道的是Ownby 和 Tsuchiya分别对C. Atrox蛇毒及T. Flaroridis 蛇毒的出血毒组分进行研究。Ownby等从电镜观察到出血毒素对血管内皮有直接溶解作用。Tsuchiya等则观察到在该毒素作用下，红细胞能直接穿过内皮细胞接合区，逸出到血管外。但出血毒素和血管壁的相互作用以及更进一步的机理均未阐明。本文用过氧化物酶标记出血毒素Ⅰ，经电镜观察，了解出血毒素在生物体内作用部位。

本实验对电镜样品未作常规染色，完全用HRP催化过氧化氢和3，3′——二氨基联苯胺四盐酸盐的显色反应显示组织结构，以期真实地反映AaHI的作用位点。电镜下可见特异性染色集中于毛细血管内皮细胞外壁周围，而在其他组织结构处未见明显的特异性染色。由此可推测，AaHI在毛细血管内皮细胞外壁有相应受体或作用位点。我们推测，AaHI与内皮细胞外壁受体或作用位点结合后引起受体后水平反应，继而导致毛细血管内皮细胞壁破裂（或间隙增大）而致红细胞外漏，这可能是出血毒作用机制之一。

参 考 文 献

康蹇娣　1981　尖吻蝮蛇素小鼠骨骼肌和心肌损伤的电子显镜初步观察。《动物学研究》2（4）增刊　97。

朱培坤　1983　《免疫酶技术》山东科学出版社。

Nakane, P. K. and Karwaoi, A. 1974 Peroxidase-labelled antibody——A new method of conjugation. *J. Histochem.* 22(12)1084.

Ownby, C. L., Kainer, R. A. and Tu, A. T. 1974 Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom. *Am. J. Pathol.* 75 401.

Tsuchiya, M., Ohshio, C., Ohashi, M., Ohsaka, A., Suzuki, K. and Fujshiro, Y. 1974 Cinematographic and electron microscopic analysis of the hemorrhage induced by the main hemorrhagic principle HRI, isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Throm. Diath. Haemorrh., Suppl. LX. 439.

Xu, X., Wang, C., Liu, T. and Lu, Z. 1981 Purification and characterization of hemorrhagic components from *Agkistrodon acutus* (Hundred Pace Snake) venom. *Toxicon* 19(5)633.

THE EFFECT OF HEMORRHAGIN I (*AGKISTRODON ACUTUS*) IN CAPILLARIES PEROXIDASE CONJUGATED METHODS

He Huaping　Wang Yuzhen　Xu Xun

(Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei)

Hemorrhagin I (AaHI) isolated from *A. acutus* venom causes rupture of vascular system and extensive hemorrhage. The specific attachment of HRP-AaHI to the endothelial cell by the method of horseradish peroxidase conjugation is reported in this paper. The results suggest that receptor or binding site of hemorrhagin I might be present on the outer-membrane of endothelial cells.

Key word: Agkistrodon acutus, Hemorrhagiw, Enzyme labeling, Snake venom